一株内生真菌 *Talaromyces* sp.次级代谢产物及其活性

薛欣怡 [1]，张翼 [1,2,3]，冯昀铠 [1]，廖清楠 [1]，胡雪琼 [1]，刘亚月 [1,2,3*]

（1. 广东海洋大学 食品科技学院，广东 湛江 524088；2. 广东海洋大学深圳研究院海洋医药研发中心，广东 深圳 518120；3. 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心，大连工业大学，辽宁 大连 116034）

摘 要：为了研究红树杨叶肖槿来源内生真菌 *Talaromyces* sp. YX-001 的次级代谢产物及其乙酰胆碱酯酶（acetylcholinesterase, AChE）抑制活性，该文运用硅胶柱层析和 HPLC 等手段从菌株 YX-001 的 PDB 培养基发酵提取物中分离得到单体化合物，而后结合 1/2D NMR 和 MS 等现代波谱技术并与文献数据对比鉴定其结构，最后通过比色法测定各单体化合物的 AChE 抑制活性。结果表明：（1）共分离得到 9 个单体化合物，分别为 asterrelenin (**1**)，aszonalenin (**2**)，cladosporisteroid C (**3**)，sitosterol (**4**)，ergosterol (**5**)，cyclo-Ile-Pro-diketopiperazine (**6**)，cyclo(-Pro-Val) (**7**)，4-methoxy-2-methylisoquinolin-1-one (**8**)和 allantoin (**9**)。（2）其中化合物 **1** 和 **2** 显示出一定的 AChE 抑制活性，IC_{50} 值分别为 81.5 和 105.8 μmol·L^{-1}。该文首次对杨叶肖槿来源内生真菌次级代谢产物及其 AChE 抑制活性进行了研究，为后续红树植物杨叶肖槿来源内生真菌资源的开发与再利用奠定了基础。

关键词：杨叶肖槿，红树内生真菌，次级代谢产物，AChE 抑制活性，海洋天然产物

中图分类号：Q946 **文献标识码：**A 文章编号：

Secondary metabolites and activities of the endophytic fungus *Talaromyces* sp.

XUE Xinyi[1], ZHANG Yi[1,2,3], FENG Yunkai[1], LIAO Qingnan[1], HU Xueqiong[1], LIU Yayue[1,2,3*]

(1. *College of Food Science and Technology*, *Guangdong Ocean University*, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; 2. *Center for Marine Drugs Research & Development*, *Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University*, Shenzhen 518120, Guangdong, China; 3. *Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing*, *Dalian Polytechnic University*, Dalian 116034, Liaoning, China)

Abstract: In order to study on secondary metabolites and their acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity of the endophytic fungus *Talaromyces* sp. YX-001 derived from mangrove *Thespesia populnea*. The strain was fermented and cultured with 2% salinity PDB medium, and then subjected to silica gel column chromatography, semi-preparative HPLC, sephadex LH-20,

基金项目：国家自然科学基金(21807015)；广东海洋大学博士启动项目(R18008)；湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(2020A01030)；广东省扬帆计划引进紧缺拔尖人才项目(201433009)；深圳市科创委基础研究面上项目(JCYJ20190813105005619)；深圳市大鹏新区科技研发项目(KJYF202001-07)；广东省普通高校重点领域专项(生物医药与健康)(2021ZDZX2064)；广东省科技专项资金-基础与应用基础研究专题(2021A50114)；湛江市海洋经济创新发展示范市建设项目(湛海创 XM-202008-01B1) [Supported by National Natural Science Foundation(21807015); The Program for PhD Research Start-Up Funds of Guangdong Ocean University(R18008); The Science and Technology Development Special Fund Competitive Allocation Project of Zhanjiang City(2020A01030); The Yangfan Talent Project of Guangdong Province(201433009); The Basic Research Project of Shenzhen Science and Technology Innovation Commission (JCYJ20190813105005619); Shenzhen Dapeng New District Scientific and Technological Research and Development Fund(KJYF202001-07); Special Project in Key Fields of Guangdong Provincial Higher Education Institutions(Biomedicine and Health care)(2021ZDZX2064); Guangdong Provincial Special Project in Science and Technology (2021A50114); The Innovation and Development Project about Marine Economy Demostration of Zhanjiang City (Zhan-Hai-Chuang XM-202008-01B1)]。

第一作者：薛欣怡(1997−)，硕士研究生，研究方向为海洋天然产物，(E-mail) xuexinyi_3630@163.com。

***通信作者：**刘亚月，博士，讲师，研究方向为海洋天然产物，(E-mail) yayue_liu@163.com。

ODS and recrystallization. Nine compounds were identified using modern spectral techniques such as MS and 1/2D NMR, and comparing with literature data. All isolates were evaluated for their AChE inhibitory activities using ellman's colorimetric method. The results were as follows: (1) Nine compounds are identified as asterrelenin (**1**), aszonalenin (**2**), cladosporisteroid C (**3**), sitosterol (**4**), ergosterol (**5**), cyclo-Ile-Pro-diketopiperazine (**6**), cyclo(-Pro-Val) (**7**), 4-methoxy-2-methylisoquinolin-1-one (**8**), and allantoin (**9**). (2) The activities results show that compounds **1** and **2** display moderate acetylcholinesterase inhibitory activities with IC_{50} values of 81.5 and 105.8 $\mu mol \cdot L^{-1}$, while other compounds don't display significant inhibitory activities (IC_{50} > 200 $\mu mol \cdot L^{-1}$). In this paper, the secondary metabolites and AChE inhibitory activities of endophytic fungi derived from *Thespesia populnea* were studied for the first time, which laid a solid foundation for the subsequent development of endophytic fungi resources from *Thespesia populnea.*

Key words: *Thespesia populnea*, Mangrove endophytic fungus, secondary metabolites, AChE inhibitory, Marine natural product

红树林是一组多样化的耐盐植物，其主要生长在亚热带、热带地区的海洋和陆地交汇处，与木本植物、动物、相关微生物和非生物因素等构成了受周期性潮汐影响为特征的红树林生态系统（Ancheeva et al., 2018）。由于其特殊的生态环境，红树林生态系统中形成了一个以真菌和细菌为主的活跃的微生物群落（Maduranga et al., 2018）。而红树林真菌来源的次级代谢产物多具有骨架新颖、生物活性多样等特点，已成为具有药理活性的先导化合物的重要来源。自 Poch 和 Gloer（1989）第一次研究红树林来源的真菌 *Helicascus kanaloanus* 的代谢产物开始，到 2021 年为止，研究人员已经从 325 株红树林真菌中发现超过 1 387 个新的化合物，占海洋真菌代谢产物的 25%（Chen et al., 2022）。新化合物结构类型涵盖聚酮，萜类，生物碱，多肽等，并且具有广泛的生物活性，如细胞毒性（Li et al., 2021）、抗菌（后文等，2021）、抗氧化（Yurchenko et al., 2021）、卤虫致死（Law et al., 2021）、抗炎（Chen et al., 2021）、酶抑制剂（Xiao et al., 2012）等。进一步统计发现，这些化合物来自 69 个不同种属的红树林衍生真菌，包括 *Penicillium*, *Aspergillus*, *Pestalotiopsis* 和 *Talaromyces* 等。

Talaromyces sp.作为新天然产物的生产者之一占比 2%，是一种具有代表性的红树内生微生物真菌属，属于散囊菌目、发菌科、蓝状菌属，多从土壤、植物、海绵等中分离，已报道的次级代谢产物具有广泛的药理活性，具有重要的应用价值（Nicoletti et al., 2018）。如中山大学余志刚课题组李翰祥等（2011）从红树植物无瓣海桑(*Sonneratia apetala*)来源的 *Talaromyces flavus* 次代谢产物中分离得到 4 个新的化合物 talaperoxides A-D，其中化合物 B 和 D 对人肿瘤细胞株 MDA-MB-435、MCF-7、HepG2、PC-3 和 HeLa 均具有良好抑制效果，IC_{50}值为 0.70～2.78 $\mu mol \cdot L^{-1}$。刘凡等（2010）从红树植物秋茄（*Kandelia candel*）来源内生真菌 *Talaromyces* sp. ZH-154 次代谢产物中分离得到 5 个已知化合物穗花衫双黄酮、天精、癸二酸 A、大黄素、和 3,6,8-三羟基-1-甲基呫吨酮，以及 2 个新化合物，并评估了所有分离化合物的抗菌和体外细胞毒活性。结果发现癸二酸 A 和大黄素均具有较好的抗菌和体外细胞毒性。卫白等（2021）从 *Armadillidium vulgare* 相关的 *Talaromyces albobiverticillius* 培养物中分离出两种新的 azaphilone 类化合物 talaralbols A-B，活性测试表明 tararalbol A 在 RAW264.7 细胞中显示一定的抗炎活性，在浓度为 10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 时抑制率为 31.0%。

AChE 属于丝氨酸水解酶类，在生物神经传导过程中具有关键作用，其可将乙酰胆碱（acetylcholine, ACh）水解成胆碱和乙酸，使神经信号在体内无法正常传递（Knight et al., 2018）。且研究表明，神经系统中的 ACh 含量与患者学习和记忆功能有关（Cacabelos et al., 2020）。因此，如果将胆碱酯酶抑制，使 ACh 含量增加，便有可能改善患者的学习和记忆功能。目前临床上使用的 galanthamine 和 rivastigmine 等均为天然来源的 AChE 抑制剂类药

物（Hung et al., 2017），且石杉碱甲、毒扁豆碱、小檗碱等天然产物也被发现具有较好的AChE 抑制活性（Akıncıoğlu et al., 2020）。Ramli 等（2014）从植物 *Stichoneuron caudatum* 中分离到的 sessilistemonamines E 对 AChE 具有显著的抑制活性，其 IC_{50} 值为 9.10 μmol·L^{-1}。Zhan 等（2016）从植物 *Zephyranthes candida* 的提取物中分离得到的 plicamine 和 secoplicamine 具有一定的 AChE 抑制活性，其 IC_{50} 值为 0.48~168.70 μmol·L^{-1}。崔璐等（2016）从中药加味补中益气汤中发现的 5 个呋喃酮类化合物均具有较好的 AChE 抑制活性，其 IC_{50} 值小于 12 μmol·L^{-1}。综上所述，红树来源内生真菌 *Talaromyces* sp.次级代谢产物具有 AChEI 药物先导化合物发现的良好潜力。

杨叶肖槿（*Thespesia populnea*）作为传统的民间药用植物，主要分布在太平洋、印度洋等热带海岸地区，在我国则主要生长于广西、广东和海南等沿海一带，具有广泛的药用价值（田艳等，2003）。《新华本草纲要》记载：其性苦、寒；全株能清热解毒，消肿止痛（Gritto et al., 2015）。2006 年印度学者在对 312 只小鼠的研究实验中发现，其树皮提取物具有降低胆固醇功能和增强记忆的活性（Vasudevan & Parle, 2006）。Changwong 等（2012）在对杨叶肖槿植物提取物研究中分离得到了五个萘醌（mansonone C- H），AChE 抑制活性结果表明，mansonone E 具有较好的抑制活性[IC_{50} 值为（23.5 ± 6.4）μmol·L^{-1}]。因此，以药用红树植物杨叶肖槿为研究对象，从中筛选出 AChEI 具有一定的可行性。但杨叶肖槿是一类高等植物，具有生长周期长、资源有限、活性物质含量低等特点，这为新药的发现增加了难度。而内生真菌由于与宿主植物长期共处，其产生的药用活性成分可能与宿主相同或相似的，且具有可人工大规模、循环发酵培养，生长周期短等特点，即可有效的解决红树植物的资源不足的问题，同时又能够产生丰富多样和活性显著的化合物，已成为海洋活性先导化合物的主要来源（Eam et al., 2021）。

本研究以 1 株红树植物杨叶肖槿来源内生真菌 *Talaromyces* sp. YX-001 为研究对象，采用 PDB 培养基对菌株进行发酵培养，并综合运用硅胶、凝胶柱层析、HPLC 和重结晶等分离手段和 MS、1/2D NMR、X-Ray 单晶衍射等现代波谱技术，对其次级代谢产物进行了研究。拟探讨以下 2 个问题：（1）红树植物杨叶肖槿来源内生真菌次级代谢产物的丰富性及主要结构类型。（2）红树植物杨叶肖槿来源内生真菌次级代谢产物作为 AChEI 的潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

内生真菌 *Talaromyces* sp. YX-001 分离自湛江红树林自然保护区的红树植物杨叶肖槿的根部，采用真菌 ITS 引物（ITS1 和 ITS4）对其 DNA 序列进行扩增（Yong et al., 2008），所得的碱基序列提交到 NCBI 网站，在 Genebank 中用 Blast 进行相似性分析，鉴定为 *Talaromyces* sp.。该菌株的碱基序列同时也已提交至 Genbank（登录号：MN826194），现保存于广东海洋大学食品科技学院海洋药物研究所。

PDB 培养基：分别称取 500 mL 马铃薯汁，20 g 葡萄糖，5 g 蛋白胨，20 g 海盐，而后加纯水定容至 1 L，最后灭菌 30 min（压力 1×10^5 Pa），备用。

1.2 主要试剂与仪器

试剂：碘代硫代乙酰胆碱（acetylthiocholine iodide, ATCI, 批号：DA0048）、AChE（批号：C3389）、牛血清蛋白（bovine serum albumin, BSA, 批号：A1933）均购买于美国 Sigma-Aldrich 公司；5, 5'-二硫代二硝基苯甲酸（dithiobisnitrobenzoic acid, DTNB, 批号：D8130），购买于 Ruibio 公司；其他实验试剂均为国产分析纯。

仪器：霉菌培养箱和生物安全柜，购自上海博讯实业有限公司医疗器械厂；WFH-201B 多功能紫外透射仪，购自上海精科实业有限公司；Agilent X 射线单晶衍射，铜靶、1260 Infinity Ⅱ高效液相色谱仪，购自美国 Agilent 公司；R-300 旋转蒸发仪，购自上海爱朗仪器有限公

司；Epoch2 酶标仪，购自美国 BioTek 公司；薄层层析版（GF_{254}）、柱层析硅胶（200-300 目），均购自青岛凯邦；ODS 色谱填料，购自日本 YMC 公司；Sephadex LH-20，购自瑞士 GE-Healthcare Bio-sciences 公司。

1.3 研究方法

1.3.1 发酵与提取

将菌株 YX-001 冻存管置于培养箱过夜活化（温度 28 ℃、湿度 80%）。再将菌种接种到预先灭菌的 PDB 培养基中摇床培养 3~4 d（100 $r{\cdot}min^{-1}$），待菌落孢子形成后将种子液接种至含有 400 mL 培养基的 1 L 锥形瓶内进行培养，共接种 50 瓶，总共发酵培养 20 L，于室温下，静置培养 30 d。

发酵液经纱布过滤，获得菌丝体和菌液；其中菌丝体用等体积的甲醇浸泡 3 次，菌液则用乙酸乙酯萃取 3 次，减压浓缩，分别获得甲醇提取物与乙酸乙酯提取物，将其合并后，再次将粗提取物用乙酸乙酯萃取 3 次，减压浓缩获得粗浸膏。

1.3.2 分离与纯化

将粗浸膏溶解，加入等体积的硅胶拌样，而后通过正相硅胶柱进行初步分离，以正己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷和甲醇为洗脱剂依次洗脱后，收集得到其中 4 个组分（Fr. 1~Fr. 4）。各组分经 TLC 检测后，合并 Fr. 2 和 Fr. 3（记为 Fr. A）。对 Fr. A 进行正相硅胶柱层析，用正己烷-乙酸乙酯（体积比为 90:10，70:30，50:50，25:75，0:100）梯度洗脱，收集得到 5 个组分（Fr. A-1~Fr. A-5）。组分 Fr. A-4 经正相硅胶柱，用二氯甲烷-甲醇（体积比为 50:1，20:1，10:1，5:1，1:1，0:1）梯度洗脱，收集得到 8 个组分 Fr. A-4-1~Fr. A-4-8。将组分 Fr. A-4-4 通过半制备 HPLC 分析，流动相为甲醇-水（体积比为 85:15），流速为 2 $mL{\cdot}min^{-1}$，相应获得化合物 **1** (t_R = 18.5 min，7.5 mg)和 **6** (t_R = 23.8 min，2.5 mg)。组分 Fr. A-4-5 通过半制备 HPLC 分析，流动相为甲醇-水（体积比为：90:10），流速为 2 $mL{\cdot}min^{-1}$，相应获得化合物 **7** (t_R = 18.5 min，3.6 mg)。组分 Fr. A-3 经 Sephadex LH-20 凝胶柱（洗脱剂为：甲醇/二氯甲烷=1:1, (v/v)），分离得到化合物 **2** (6.6 mg)。组分 Fr. A-2 经硅胶柱层析，以正己烷-二氯甲烷（体积比 70:30，50:50，25:75，0:100）梯度洗脱，获得 4 个组分 Fr. A-2-1~ Fr. A-2-4。将组分 Fr. A-2-4 经 Sephadex LH-20 凝胶柱（洗脱剂为：甲醇/二氯甲烷=1:1, (v/v)）洗脱，获得化合物 **4** (2.6 mg)和 **9** (9.6 mg)；Fr. A-2-1 置于常温下静置一段时间，待溶剂挥发后得到针状晶体，而后用正己烷洗涤 3 次，获得化合物 **5**（17.5 mg）。Fr. A-2-3 以二氯甲烷-甲醇为溶剂进行重结晶，得到的晶体再分别用正己烷和氯仿洗涤 3 次后，获得化合物 **3** (5.7 mg)。Fr. A-5 置于常温下静置一段时间，待溶剂挥发后得到白色固状不溶物，而后用甲醇洗涤 3 次，获得化合物 **8** (9.7 mg)。

图 1 化合物 **1-9** 的结构式

Fig. 1 Structure of compounds **1-9**

1.3.3 AChE 抑制活性测试

利用文献报道的 Ellman's 比色法（Kaufmann et al., 2011）对各单体化合物的体外 AChE 抑制活性进行了测定。样品用甲醇溶解，配制成浓度为 200 μmol·L^{-1} 的溶液，备用。采用倍半梯度稀释法对样品进行稀释后，加入 96 孔板中，每孔 100 μL，待挥干后。再依次往每孔中加入 DMSO 1 μL、PBS 49 μL、0.2 U·mL^{-1} 的 AChE 10 μL 和 DTNB 20 μL，置于培养箱(37 ℃)培养 10 min 后，加入 20 μL 的底物 ATCI，继续孵育 20 min。最后通过酶标仪测定溶液在λ_{405} nm 处的光密度值 $D_{405\ nm}$，每组设 3 个平行。实验对照组：将 AChE 酶溶液换成等体积的 BSA 溶液，其他同实验组；空白组：不加入待测样品，其他同实验组；空白对照组：不加入待测样品，其他同实验对照组。本实验阳性对照为盐酸多奈哌齐（Paleacu et al., 2002）。通过下述公式计算化合物对 AChE 的抑制率后利用 Origin 9.1 计算各单体化合物的 IC$_{50}$ 值。

抑制率=[（$D_{空白}-D_{空白对照}$）−（$D_{实验}-D_{实验对照}$）]/（$D_{空白}-D_{空白对照}$）×100%

2 结果与分析

2.1 菌株的鉴定

菌株 YX-001 经 rDNA 的 ITS 序列测定，测序结果如下：

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCGCGGCCCAACCTCCCACCCTTGTCTCATATACCTGTTGCTTCGGCGGGCCCACCGGGGCCACCTGGTCGCCGGGGGACGTCTGTCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGCGCCCTTTGAACCCTGATGAAGATGGGCTGTCTGAGTGATATGAAAATTGTCAAAACTTTCAACAACGAATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT

TCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATG
CCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCTCC
GGGGACCTGCCCGAAAGGCAGCGGCGACGTCCGTCTGGTCCTCGAGCGTATGGGGCT
CTGTCACTCGCTCGGGAAGGACCTGCGGAGGTTGGTCACCACCACATCTTTTTTACAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAGTTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA
GGAA

首先从 NCBI 数据库中选择与菌株 YX-001 序列相似性较高的已有序列，而后进行 BLAST 比对，结果发现前 20 条序列全部属于 *Talaromyces* sp.，其相似度为 99%~100%，覆盖率为 99%~100%。最后利用 MEGA 7.0 构建进化树（Sudhir et al., 2016）（图 2），进化树结果进一步表明 YX-001 属于 *Talaromyces* sp.。

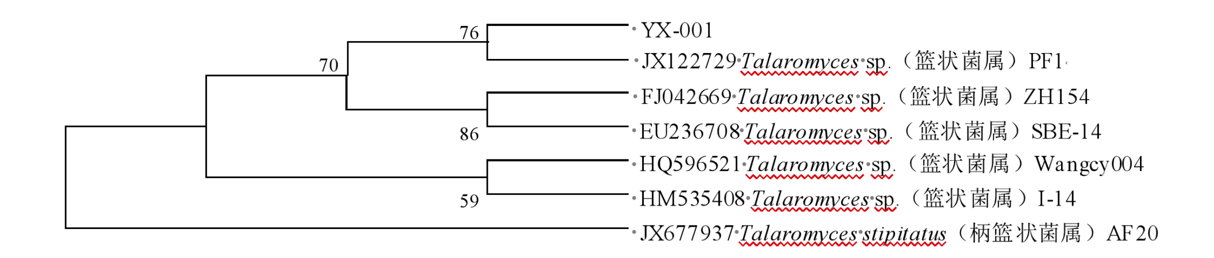


图 2 YX-001 菌株系统发育树

Fig. 2 Evolutionary tree of YX-001

2.2 结构鉴定

化合物 **1**，浅黄色粉末，EI 质谱显示分子离子峰为 *m/z* 431 $[M]^+$。^{1}H NMR 谱图给出了 1 个氨基质子信号δ_H 10.12，8 个芳香质子信号δ_H 7.85 (dd, J = 7.8, 1.1 Hz, 1H)，δ_H 7.64 (m, 1H)，δ_H 7.42 (m, 1H)，δ_H 7.40 (dd, J = 7.6, 1.0 Hz, 1H)，δ_H 7.17 (m, 1H)，δ_H 7.12 (m, 1H)，δ_H 7.07 (td, J = 7.6, 0.8 Hz, 1H)和δ_H 6.94 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H)，1 个孤立质子信号δ_H 6.19 (br s, 1H)，1 组亚甲基质子信号δ_H 3.57 (d, J = 13.7, 1H)和δ_H 2.43 (d, J = 13.7 Hz, 1H)，3 个甲基质子信号δ_H 2.60，1.07 和 0.86，均为单峰，3 个双键烯烃质子信号δ_H 5.90 (dd, J = 17.3, 10.8 Hz, 1H)，δ_H 5.11 (d, J = 10.8 Hz, 1H)和δ_H 5.10 (d, J = 17.3 Hz, 1H)以及 1 个羟基质子信号δ_H 4.08。^{13}C NMR 谱图中显示有 25 个碳信号：包括 3 个酮羰基碳信号δ_C 170.0，168.8 和 166.4；3 个甲基碳信号δ_C 22.8，23.1 和 23.9；2 个连杂原子的碳信号δ_C 88.3 和 81.5；1 个亚甲基碳信号δ_C 40.7；2 个 sp^3 杂化的季碳信号δ_C 57.6 和 40.7；14 个成对出现的 sp^2 杂化碳信号。HMBC 谱图中（图 3）：H-2'和 C-1'，C-5'有相关；H-4'和 C-1'，C-2'有相关；H-5'和 C-3 有相关；H-10 和 C-2，C-3，C-11 有相关；H-2"和 C-1"有相关；H-5 和 C-3，C-7，C-9 有相关；H-6 和 C-5，C-7 有相关；H-8 和 C-7，C-9 有相关；H-18 和 C-15，C-20 有相关；H-20 和 C-19，C-21 有相关；H-21 和 C-14，C-16，C-19 有相关；以及氨基质子和 C-11，C-12，C-18 有相关。结合文献发现，该化合物的核磁数据与已知化合物 asterrelenin（Li et al., 2005）的核磁数据一致，因此鉴定化合物 **1** 为已知化合物 asterrelenin。

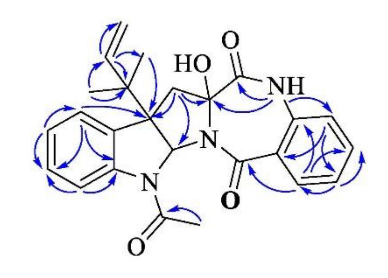


图 3 化合物 **1** 的 HMBC 相关示意图

Fig. 3 The HMBC correlations of compound **1**

化合物 **2**，浅黄色晶体，EI 质谱显示分子离子峰为 *m/z* 373 [M]$^+$。通过对比 ^{1}H 和 ^{13}C NMR 数据可知（表 1），化合物 **1** 和 **2** 具有相似的骨架结构，除了化合物 **2** 比 **1** 少了一个羰基碳信号δ_C 170.0 和一个甲基信号δ_C 23.9 和δ_H 2.60，以及多了 1 个质子信号δ_H 4.39。通过检索文献（Kimura et al., 1982），确定化合物 **2** 为已知化合物 aszonalenin。

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的 ^{1}H 和 ^{13}C NMR 数据表（500/125 MHz, DMSO)

Table 1 ^{1}H and ^{13}C NMR data of compounds **1** and **2** (500/125 MHz, DMSO)

位置	**1**		**2**	
Position	δc	$\delta_{H,}$ mult (J·Hz^{-1})	δc	$\delta_{H,}$ mult (J·Hz^{-1})
2	81.5	6.19, br s	80.7	5.95, br s
3	57.6	—	58.5	—
4	137.5	—	134.0	—
5	130.5	7.40, dd (7.6, 1.0)	125.4	7.19, m
6	118.2	7.07, td (7.6, 0.8)	122.3	6.95, m
7	128.4	7.17, m	130.9	7.05, m
8	127.5	7.64, m	109.4	6.65, m
9	142.0	—	138.4	—
10	40.7	2.43, d (13.7) 3.57, d (13.7)	42.6	2.38, dd (13.1, 7.8) 3.25, dd (13.1, 7.4)
11	88.3	—	62.9	4.39, m
12	168.8	—	168.6	—
14	137.3	—	145.6	—
15	124.9	—	127.0	—
16	166.4	—	172.5	—
18	120.5	6.94, dd (8.0, 1.4)	119.4	6.91, m
19	133.0	7.42, m	129.3	7.41, m
20	123.4	7.12, m	125.5	7.13, m
21	130.4	7.85, dd (7.8, 1.1)	127.5	7.71, dd (7.7, 0.9)
1'	40.7	—	40.9	—
2'	144.2	5.90, dd (17.3, 10.8)	144.0	5.86, dd (17.6, 10.7)

3'	114.3	5.10, d (17.3) 5.11, d (10.8)	113.9	5.09, d (17.6) 5.08, d (10.7)
4'	22.8	0.86, s	22.8	0.87, s
5'	23.1	1.07, s	22.1	1.01, s
1''	170.0	—	—	—
2''	23.9	2.60, s	—	—
11—OH'	—	4.08, s	—	—
2—NH	—	—	—	8.15, s
13—NH	—	10.12, s	—	—

化合物 **3**，为白色晶体，EI 质谱显示分子离子峰为 *m/z* 374 $[M]^+$。通过培养首次成功获得了化合物 **3** 的单晶，而后利用铜靶 X-Ray 单晶衍射技术确定了该化合物的结构（图 4），其单晶数据如表 2。结合单晶结构和分子量可知，化合物的分子式应为 $C_{23}H_{34}O_4$。但是分析 ^{1}H 和 ^{13}C NMR 谱图可知，碳谱中只给出 21 个碳信号，包括 3 个酮羰基碳的信号 δ_C 210.2，208.1 和 197.7；一组成对的烯烃碳信号 δ_C 163.0 和 122.3；3 个甲基碳信号 δ_C 31.2，13.4 和 12.2；以及 13 个 sp^3 杂化的碳。对比单晶结构，缺乏了 2 个甲氧基碳信号，增加了 1 个酮羰基碳信号（表 3）。氢谱中也只给出了 1 个孤立的烯烃质子信号 δ_H 5.61；3 个甲基质子信号 δ_H 2.11，0.94 和 0.49；以及 17 个在高场区域（δ_H 1.49~2.79）的质子信号，无甲氧基质子信号。通过检索文献发现，其核磁数据与已知化合物 Pregn-7-dien-3,6,20-trione (**3a**)一致（Lee et al., 2020）。查阅文献可知，化合物 **3** 上的双甲氧基结构不稳定，在一定条件下容易脱去，自动氧化成羰基（Gurst et al., 1973）。因此，我们推测化合物 **3** 在溶液中化学结构发生了转变，C-3 上的双甲氧基会脱去，自动氧化成羰基，生成高度氧化产物 Pregn-7-dien-3,6,20-trione (**3a**)。通过检索文献，确定化合物 **3** 为已知化合物 cladosporisteroid C（Pang et al., 2018）。

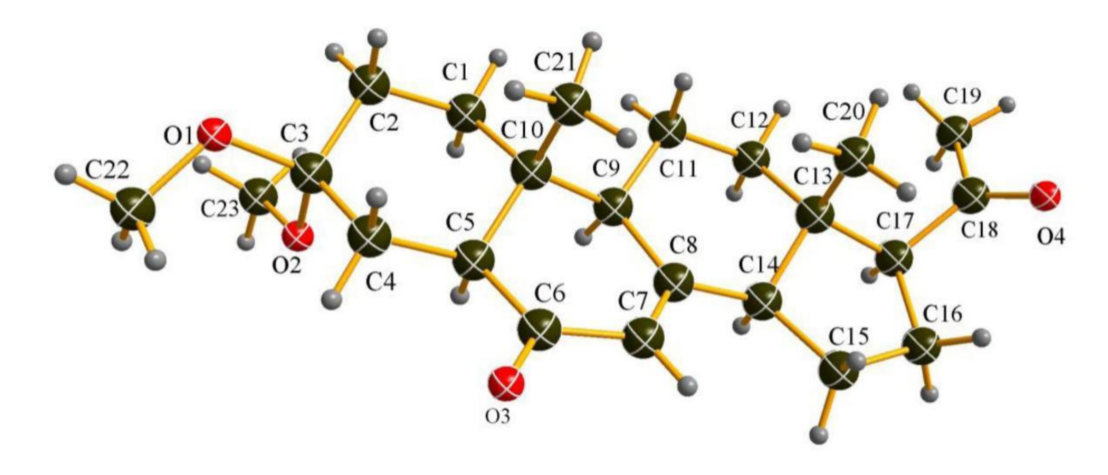


图 4 化合物 **3** 的单晶 ORTEP 图

Fig. 4 Perspective ORTEP drawing of Compound **3**

表 2 化合物 **3** 的单晶衍射数据表

Table 2 Crystal parameters of Compound **3**

参数 Parameter	**3**

分子式 Molecular formula	$C_{23}H_{34}O_4$
分子量 Molecular weight	374.50
波长 Wavelength	0.154 178 nm
晶系 Crystal system	orthorhombic
空间群 Space group	P2(1)2(1)2(1)
晶胞参数 Crystal cell parameter	a = 6.4065(1) nm α= 90° b = 6.9147(1) nm β= 90° c = 44.9783(10) nm γ= 90°
晶胞体积 Crystal cell volume	1992.50(6) nm
晶胞包含的分子数 The number of molecules in a cell	4
晶体大小 Crystal size	0.4 2 mm× 0.37 mm × 0.06mm
衍射点范围 Diffraction point range	3.931 to 66.994°
衍射指标范围 Diffraction index range	-5≤h≤7, -8≤k≤7, -53≤l≤52
衍射点数 / 几何限制数目/ 参数数目 Diffraction points/number of geometric constraints/number of parameters	3498 / 0 / 249
F^2拟合度值 F2 fit degree value	1.140
最终的R i指数 [I>2sigma(I)] Final R i exponent [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0.0416, wR2 = 0.0893
R指数 Index of the R	R1 = 0.0381, wR2 = 0.0907
绝对结构参数 Absolute structural parameter	-0.03(15)
残余电子密度峰值和谷值 Residual electron density peaks and valleys	0.139-0.198

表 3 化合物 **3** 和 **3a** 的 ^{13}C NMR 数据表

Table 3 ^{13}C NMR data of compounds **3** and **3a**

位置 Position	**3**[a] δ_C, type	**3a**[b] δ_C, type	位置 Position	**3**[a] δ_C, type	**3a**[b] δ_C, type
1	34.8, CH_2	31.1, CH_2	13	45.3, C	44.7, C
2	27.5, CH_2	36.7, CH_2	14	55.4, CH	53.3, CH
3	100.1, C	210.2, C	15	22.9, CH_2	22.0, CH_2

4	28.0, CH_2	36.8, CH_2	16	22.7, CH_2	22.3, CH_2
5	51.9, CH	54.4, CH	17	63.2, CH	62.0, CH
6	200.2, C	197.1, C	18	208.4, C	208.1, C
7	123.8, CH	122.3, CH	19	31.4, CH_3	31.1, CH_3
8	161.6, C	163.0, C	20	13.7, CH_3	13.4, CH_3
9	49.7, CH	48.1, CH	21	12.7, CH_3	12.7, CH_3
10	38.5, C	37.9, C	OCH_3-1	47.8, CH_3	—
11	21.7, CH_2	21.3, CH_2	OCH_3-2	47.4, CH_3	—
12	37.9, CH_2	36.7, CH_2	—	—	—

注：[a] 记录为 DMSO；[b] 记录为 $CDCl_3$。

Note: [a] Recorded in DMSO；[b] Recorded in $CDCl_3$.

oxidate

氧化

3 **3a**

图 5 化合物 **3** 在一定条件下氧化成化合物 **3a** 的反应

Fig. 5 The oxidation reaction of compounds **3** to **3a** under certain conditions

化合物 **4**，白色粉末，EI 质谱显示分子离子峰为 *m/z* 414 $[M]^+$。经 EI 分子数据库检索为 sitosterol（Prinsen et al., 2014）。与文献数据对比一致，确认化合物 **4** 为已知化合物 sitosterol。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)：5.29 (m, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.41(d, J = 5.7 Hz, 1H), 2.24~2.32 (m, 2H), 1.84~1.98(m, 2H), 1.59~1.90 (m, 8H), 1.47~1.57 (m, 3H), 1.13~1.53 (m, 13H), 1.01 (m, 1H), 0.98 (s, 3H), 0.90 (dd, J = 6.1, 1.8 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.3 Hz, 6H)。

化合物 **5**，白色针状晶体，EI 质谱显示分子离子峰为 *m/z* 396 $[M]^+$。TLC 分析发现该化合物在展开剂为石油醚:乙酸乙酯=2:1 时，R_f值约为 0.3，且有紫外，浓硫酸-香草醛溶液下呈现紫黑色。通过与已知化合物麦角甾醇（Mishra et al., 1996）的 TLC 指纹特征进行比对，故确定化合物 **5** 为 ergosterol。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)：5.59 (dd, J = 5.6, 2.5 Hz, 1H), 5.35~5.44 (m, 1H), 5.16~5.32 (m, 2H), 3.55~3.65 (m, 1H), 2.42~2.50 (m, 1H), 2.22~2.31 (m, 2H), 2.04 (m, 3H), 1.28~1.85 (m, 3H), 1.04 (t, J = 6.2 Hz, 4H), 0.91~0.97 (m, 7H), 0.80~0.98 (m, 8H), 0.72~0.84 (m, 3H)。

化合物 **6**，白色固体，EI 质谱显示分子离子峰为 *m/z* 210 $[M]^+$。^{13}C NMR 谱显示分子中含有 11 个 C，包括 2 个甲基碳信号δ_C 15.1 和 11.5；2 个酰胺碳信号δ_C 169.0 和 164.7；以及 7 个 sp^3 杂化碳信号。^{1}H NMR 谱中则给出了一个活泼氢信号δ_H 6.20 (1H, br s)；2 个甲基质子信号δ_H 0.89 和 1.08；以及在高场区域(δ_H 1.19~4.23)的 11 个质子信号。通过与文献对比（Chen et al., 2012），确定化合物 **6** 为已知化合物 cyclo-Ile-Pro-diketopiperazine。^{1}H NMR($CDCl_3$)：6.20(br s, 1H), 4.09(dd, J = 10.0, 6.5Hz, 1H), 3.75~3.80(m, 1H), 3.64~3.72(m, 1H), 3.49~3.57(m, 1H), 2.36~2.46(m, 1H), 2.00~2.08(m, 1H), 1.92~2.00 (m, 1H), 1.90~1.98(m, 1H), 1.82~1.94(m, 1H), 1.52~1.60(m, 1H), 1.19~1.31(m, 1H), 1.02(d, J = 7.0 Hz, 1H), 0.92(d, J = 7.0 Hz, 3H)；^{13}C NMR ($CDCl_3$)：169.0, 165.3, 63.2, 58.5, 45.7, 39.9, 29.1, 24.5, 22.1, 15.5, 11.2。

化合物**7**，白色粉末，EI质谱显示分子离子峰为*m/z* 197 $[M]^+$。通过对比化合物**6**和**7**的^{13}C和^{1}H NMR谱图发现，两者核磁数据几乎一致，除了后者比前者在高场区域少1个C信号，以及少了2个质子信号。因此，结合文献核磁数据（Yap et al., 2021），确定化合物**7**为已知化合物cyclo(-Pro-Val)。^{1}H NMR(acetone)：6.78 (s, 1H), 4.15(t, J = 8.0 Hz , 1H), 3.98(br s, 1H), 3.55(m, 1H), 3.40 (ddd, J = 12.0, 8.1, 3.5 Hz, 1H), 2.52(m, 1H), 2.36(m, 1H), 1.95(m, 2H), 1.85(m, 1H), 1.11(d, J = 7.0 Hz, 3H), 0.95(d, J = 7.1 Hz, 3H)；^{13}C NMR (acetone)：170.3, 165.6, 60.7, 59.7, 45.3, 29.1, 29.0, 22.9, 18.8, 17.0。

化合物 **8**，白色粉末，EI 质谱显示分子离子峰为 *m/z* 189 $[M]^+$。^{1}H NMR 给出了 2 个甲基质子信号δ_H 3.85 和 3.75；1 个孤立的烯烃质子信号δ_H 7.65；以及 4 个芳香质子信号 7.99 (dd, J = 7.8, 2.0 Hz), 7.71(ddd, J = 8.5, 6.8, 1.6Hz), 7.35(m), 8.23 (dd, J = 8.1, 1.3 Hz)。^{13}C NMR 谱中给出了 11 个碳信号，包括 1 个羰基碳δ_C 170.3；2 个甲基碳δ_C 57.5 和 40.0；以及 8 个成对的烯烃碳信号。通过与文献对比，确定化合物 **8** 为 4-methoxy-2-methylisoquinolin-1-one（Smetanina et al., 2017）。^{1}H NMR(400 MHz, DMSO)：8.23(dd, J = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.99(dd, J = 7.8, 2.0 Hz, 1H), 7.71(ddd, J = 8.5, 6.8, 1.6 Hz, 1H), 7.65(m, 1H), 7.35(m, 3H), 3.85(d, J = 1.39 Hz, 1H), 3.75(s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): 170.3, 142.1, 138.9, 131.4, 131.2, 125.8, 125.6, 122.2, 116.3, 57.5, 40.0。

化合物 **9**，白色粉末，EI 质谱显示分子离子峰为 *m/z* 158 $[M]^+$，经 EI 分子数据库检索为 allantoin（Liu et al., 2020），分子式为 $C_4H_6O_4$。与文献核磁数据对比一致，确认化合物 **9** 为已知化合物 allantoin。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO)：10.41 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 6.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 5.34 (d, J = 8.1 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): 173.5, 157.4, 156.4, 62.7。

2.3 AChE 抑制活性测试结果

化合物 **1-9** 的 AChE 抑制活性测试结果表明：化合物 **1** 和 **2** 均对 AChE 显示出一定的抑制活性，IC_{50} 值分别为 81.5 和 105.8 μmol·L^{-1}，其它化合物不显示明显的抑制活性（IC_{50} > 200 μmol·L^{-1}）。

3 讨论与结论

目前，国内外对红树植物杨叶肖槿的研究主要集中在植物本身的化学成分及药理活性上，但尚未见对其来源内生真菌的次级代谢产物及生物活性的有关报道。本研究综合运用硅胶柱层析和 HPLC 等多种色谱分离手段，首次对杨叶肖槿来源内生真菌 *Talaromyces* sp.YX-001 次级代谢产物进行了研究，共从中分离得到了 9 个化合物，包括 6 个含氮类化合物 asterrelenin (**1**)，aszonalenin (**2**)，cyclo-Ile-Pro-diketopiperazine (**6**)，cyclo(-Pro-Val) (**7**)，4-methoxy-2-methylisoquinolin-1-one (**8**)和 allantoin (**9**)，3 个萜类化合物 cladosporisteroid C (**3**)，sitosterol (**4**)，ergosterol (**5**)。查阅文献可知（Chen et al., 2022），在红树林真菌代谢产物中，生物碱和萜类化合物均是红树林真菌次级代谢产物的主要结构类型，分别占比 12% 和 19%，仅次于聚酮化合物（63%）。同时，生物碱及萜类化合物均是具有广泛药理活性的一类天然产物。查阅文献可知：化合物 **4-6** 与 **9** 具有一定的抗炎（Kurano et al., 2018; Lee et al., 2021; Wardecki et al., 2015）、抗虫（Pramanik et al., 2020; Meza-menchaca et al., 2019）、抗真菌（Choub et al., 2021）、抗癌（Vo et al., 2020; El-Sherif et al., 2020）、抗高血压（Chen et al., 2014）等多种生物活性；但化合物 **1**、**3** 和 **8** 的生物活性暂未见报道，化合物 **2** 目前只被报道不具备明显的抗菌活性及细胞毒性（Eamvijarn et al., 2013; May et al., 2016）。本论文首次对上述化合物的 AChE 抑制活性进行了研究。结果表明：化合物 **1** 和 **2** 显示一定的 AChE 抑制活性，IC_{50} 值分别为 81.5 和 105.8 μmol·L^{-1}。该结果进一步佐证了杨叶肖槿的树皮提取物的记忆增强功能（Solomon et al., 2015），同时表明红树植物杨叶肖槿来源内生真菌次级

代谢产物具有开发成为新的 AChEI 的潜力。因此，本论文的研究为抗 AD 新药的研究提供新的资源菌，为进一步开发与再利用红树植物杨叶肖槿来源内生真菌资源奠定了基础。

参考文献：

AKıNCıOĞLU H, GÜLÇIN İ, 2020. Potent acetylcholinesterase inhibitors: Potential drugs for Alzheimer's disease[J]. Mini Rev Med Chem, 20(8): 703-715.

ANCHEEVA E, DALETOS G, PROKSCH P, 2018. Lead compounds from mangrove-associated microorganisms[J]. Mar Drugs, 16(9): 319.

BAI W, JING LL, GUAN QY, et al., 2021. Two new azaphilone pigments from *Talaromyces albobiverticillius* and their anti-inflammatory activity[J]. J Asian Nat Prod Res, 23(4): 325-332.

CACABELOS R, 2020. Pharmacogenetic considerations when prescribing cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease[J]. Expert Opin Drug Met, 16(8): 673-701.

CHANGWONG N, SABPHON C, INGKANINAN K, et al., 2012. Acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activities of mansorins and mansonones[J]. Phytother Res, 26(3): 392-396.

CHEN G, TIAN L, WU HH, et al., 2012. Secondary metabolites from fungus *Nigrospora* sp.[J]. J Asian Nat Prod Res, 14(8): 759-763.

CHEN MF, TSAI JT, CHEN LJ, et al., 2014. Antihypertensive action of allantoin in animals[J]. Biomed Res Int, 2014: 690135.

CHEN S, CAI R, LIU Z, et al., 2022. Secondary metabolites from mangrove-associated fungi: source, chemistry and bioactivities[J]. Nat Prod Rep, 39(3): 560-595.

CHEN Y, ZOU G, YANG W, et al., 2021. Metabolites with anti-inflammatory activity from the mangrove endophytic fungus *Diaporthe* sp. QYM12[J]. Mar Drugs, 19(2): 56.

CHOUB V, MAUNG CEH, WON SJ, et al., 2021. Antifungal activity of cyclic tetrapeptide from *Bacillus velezensis* CE 100 against plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Pathogens, 10(2): 209.

CUI L, 2016. Study on AChE inhibitor in Jiawei Buzhong Yiqi soup based on data mining[D]. Guangzhou: Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 1-64. [崔露. 基于数据挖掘发现加味补中益气汤中 AChE 抑制剂的研究[D]. 广州: 广州中医药大学: 1-64.]

EAMVIJARN A, GOMES NM, DETHOUP T, et al., 2013. Bioactive meroditerpenes and indole alkaloids from the soil fungus *Neosartorya fischeri* (KUFC 6344), and the marine-derived fungi *Neosartorya laciniosa* (KUFC 7896) and *Neosartorya tsunodae* (KUFC 9213)[J]. Tetrahedron, 69(40): 8583-8591.

EL-BONDKLY EAM, EL-BONDKLY AAM, EL-BONDKLY AAM, 2021. Marine endophytic fungal metabolites: A whole new world of pharmaceutical therapy exploration[J]. Heliyon, 7(3): e06362.

EL-SHERIF NF, AHMED SA, IBRAHIM AK, et al., 2020. Ergosterol peroxide from the egyptian red lingzhi or reishi mushroom, *Ganoderma resinaceum* (agaricomycetes), showed preferred inhibition of MCF-7 over MDA-MB-231 breast cancer cell lines[J]. Int J Med Mushrooms, 22(4): 389-396.

GRITTO MJ, NANDAGOPALAN V, DOSS A, 2015. GC-MS analysis of bio-active compounds in methanolic extract of *Thespesia populnea* (L.) sol.excorrea[J]. J Pharm Pharm Sci, 4(12):

498-504.

GURST JE, SHEIKH YM, DJERASSI C, 1973. Synthesis of corticosteroids from marine sources[J]. J Am Chem Soc, 95(2): 628-629.

HOU W, WEI HX, YUAN E, et al., 2021. Screening and identification of antagonistic strains of endophytic fungi from *Cassiae cassiae* and analysis of antibacterial substances from *Penicillium citri* ZH-11[J]. Microbiol China, 48(10): 3765-3775. [后文，韦海新，袁恩，等，2021. 决明草内生真菌拮抗菌株筛选鉴定及桔青霉 ZH-11 抗菌物质分析[J]. 微生物学通报, 48(10): 3765-3775.]

HUNG SY, FU WM, 2017. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease[J]. J Biomed Sci Jul 19, 24(1): 47.

KAUFMANN D, DOGRA AK, WINK M, 2011. Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target[J]. J Pharm Pharmacol, 63(10): 1368-71.

KIMURA Y, HAMASAKI T, NAKAJIMA H, et al., 1982. Structure of aszonalenin, a new metabolite of *Aspergillus zonatus*[J]. Tetrahedron Lett, 23(2): 225-228.

KNIGHT R, KHONDOKER M, MAGILL N, et al., 2018. A systematic review and meta-analysis of the effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and memantine in treating the cognitive symptoms of dementia[J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 45(3/4): 131-151.

KURANO M, HASEGAWA K, KUNIMI M, et al., 2018. Sitosterol prevents obesity-related chronic inflammation[J]. Bba-Mol Cell Biol L, 1863(2): 191-198.

LAW JW, LAW LN, LETCHUMANAN V, et al., 2020. Anticancer drug discovery from microbial sources: the unique mangrove streptomycetes[J]. Molecules, 25(22): 5365.

LEE D, LEE SR, KANG KS, et al., 2021. Bioactive phytochemicals from mulberry: potential anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages[J]. Int J Tissue React, 22(15): 8120.

LEE SR, KANG H, YOO MJ. et al., 2020. Anti-adipogenic pregnane steroid from a *Hydractinia-associated* fungus, *Cladosporium sphaerospermum* SW67[J]. Nat Prod Sci, 26: 230-235.

LI GY, LI BG, YANG T, et al., 2005. Sesterterpenoids, terretonins A-D, and an alkaloid, asterrelenin, from *Aspergillus terreus*[J]. J Nat Prod, 68 (8): 1243-1246.

LI H, HUANG H, SHAO C, 2011. Cytotoxic norsesquiterpene peroxides from the endophytic fungus *Talaromyces flavus* isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala*[J]. J Nat Prod, 74(5): 1230-1235.

LI K, SU Z, GAO Y, et al., 2021. Cytotoxic minor piericidin derivatives from the actinomycete strain *Streptomyces psammoticus* SCSIO NS126[J]. Mar Drugs, 19(8): 428.

LIU L, LIU D, WANG Z, et al., 2020. Exogenous allantoin improves the salt tolerance of sugar beet by increasing putrescine metabolism and antioxidant activities[J]. Plant Physiol Biochem, 154: 699-713.

MADURANGA K, ATTANAYAKE RN, SANTHIRASEGRARM S, et al., 2018. Molecular phylogeny and bioprospecting of Endolichenic Fungi (ELF) inhabiting in the lichens collected from a mangrove ecosystem in Sri Lanka[J]. PLoS ONE, 13(8): e0200711.

MAY ZIN WW, BUTTACHON S, DETHOUP T, et al., 2016. New cyclotetrapeptides and a new diketopiperzine derivative from the marine sponge-associated fungus *Neosartorya glabra* KUFA 0702[J]. Mar Drugs, 14(7): 136.

MEZA-MENCHACA T, RAMOS-LIGONIO A, LÓPEZ-MONTEON A, et al., 2019. Insights into

ergosterol peroxide’s trypanocidal activity[J]. Biomolecules, 9(9): 484.

MISHRA PD, WAHIDULLAH S, DESOUZA L, et al., 1996. Lipid constituents of marine sponge *Suberites carnosus*[J]. Ind J Chem, 35B: 806-809.

NICOLETTI R, SALVATORE MM, ANDOLFI A, 2018. Secondary metabolites of mangrove-associated strains of *Talaromyces*[J]. Mar Drugs, 16(1): 12.

PALEACU D, MAZEH D, MIRECKI I, et al., 2002. Donepezil for the treatment of behavioral symptoms in patients with Alzheimer's disease[J]. Clin Neuropharmacol, 25(6): 313-317.

PANG X, LIN X, WANG J, et al., 2018. Three new highly oxygenated sterols and one new dihydroisocoumarin from the marine sponge-derived fungus *Cladosporium* sp. SCSIO41007[J]. Steroids, 129: 41-46.

POCH GK, GLOER JB. 1989. Helicascolides A and B: new lactones from the marine fungus *Helicascus kanaloanus*[J]. J Nat Prod, 52(2): 257.

PRAMANIK PK, CHAKRABORTI S, BAGCHI A, et al., 2020. Bioassay-based *Corchorus capsularis L.* leaf-derived *β*-sitosterol exerts antileishmanial effects against *Leishmania donovani* by targeting trypanothione reductase[J]. Sci Rep, 10(1): 20440.

PRINSEN P, GUTIÉRREZ A, FAULDS CB, et al., 2014. Comprehensive study of valuable lipophilic phytochemicals in wheat bran[J]. J Agr Food Chem, 62: 1664-1673.

RAMLI RA, LIE W, PYNE SG, 2014. Alkaloids from the roots of *Stichoneuron caudatum* and their acetylcholinesterase inhibitory activities[J]. J Nat Prod, 77: 894-901.

SMETANINA OF, YURCHENKO AN, IVANETS EV, et al., 2017. Aromatic Metabolites of Marine Fungus *Penicillium* sp. KMM 4672 Associated with a *Brown Alga Padina* sp.[J]. Chem Nat Compd, 53: 600-602.

SOLOMON S, MURUGANANTHAM N, SENTHAMILSELVI MM, 2015. Anti-oxidant and anti-Inflammatory activity of *Thespesia populnea* (flowers)[J]. Pharmacophore, 6(1): 53-59.

SUDHIR K, GLEN S, KOICHIRO T, 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Mol Biol Evol, 7: 1870.

TIAN Y, WU J, ZHANG C, et al., 2003. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological effects of the medicinal semi-mangrove plant *Thespesia populnea*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 34(1): 82-84. [田艳，吴军，张偲, 2003. 半红树药用植物杨叶肖槿的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 34(1): 82-84.]

VASUDEVAN M, PARLE M, 2006. Pharmacological actions of *Thespesia populnea* relevant to Alzheimer's disease[J]. Phytomedicine, 13(9/10): 677-87.

VO TK, TA QTH, CHU QT, et al., 2020. Anti-Hepatocellular-Cancer activity exerted by *β*-sitosterol and *β*-sitosterol-glucoside from *Indigofera zollingeriana* miq[J]. Molecules, 25(13): 3021.

WARDECKI T, BRÖTZ E, DEFORD C, et al., 2015. Endophytic *Streptomyces* in the traditional medicinal plant *Arnica montana* L.: secondary metabolites and biological activity[J]. Anton Leeuwenhoek J Microbiol, 108(2): 391-402.

XIAO Y, LIANG W, LIU D, et al., 2012. Isolation and acetylcholinesterase inhibitory activity of asterric acid derivatives produced by *Talaromyces aurantiacus* FL15, an endophytic fungus from *Huperzia serrata*[J]. Biotechnology, 12(3): 60.

YAP PC, AYUHAN N, WOON JJ, et al., 2021. Profiling of potential antibacterial compounds of lactic acid bacteria against extremely erug resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii*[J]. Molecules, 26(6): 1727.

YONG P, CHONG PP, LAU LY, et al., 2008. Molecular identification of *Candida orthopsilosis* isolated from blood culture[J]. Mycopathologia, 165(2): 81-87.

YURCHENKO EA, MENCHINSKAYA ES, PISLYAGIN EA, et al., 2021. Cytoprotective activity of *p*-Terphenyl polyketides and flavuside B from marine-derived fungi against oxidative stress in Neuro-2a Cells[J]. Molecule, 26(12): 3618.

ZHAN G, ZHOU J, LIU R, et al., 2016. Galanthamine, plicamine, and secoplicamine alkaloids from *Zephyranthes candida* and their anti-acetylcholinesterase and anti-inflammatory activities[J]. J Nat Prod, 79: 760-766.